

Methicillin 내성 포도구균의 *mecI*, *mecA* 및 *femA* 유전자에 관한 연구

안지영 · 김원배 · 이동화 · 이경원* · 최석호** · 김일수** · 서채형**

순천향대학교 의과대학 임상병리학교실, 연세대학교 의과대학 임상병리학교실*, 광명성애병원 유전공학 연구실**

A Study of the *mecI*, *mecA* and *femA* Genes of Methicillin-Resistant Staphylococci

Jee Young Ahn, M.D., Won Bae Kim, M.D., Dong Wha Lee, M.D., Kyungwon Lee, M.D.*,
Seok Ho Choi, M.T.**, Il Soo Kim, M.D.**, and Chae Hyung Seo M.D.**

Department of Clinical Pathology, Soonchunhyang University College of Medicine; Department of Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine*, Kwangmyung-Sungae Hospital, Research Institute of Genetic Science**, Seoul, Korea

Background : *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* are those of the important pathogens that have revealed the increase of methicillin resistance. Because of increasing prevalence of staphylococci resistant to one or more antimicrobial agents, it is necessary to determine the antibiotic susceptibility of these microorganisms. Methicillin resistance is due to the production of PBP2', which is encoded by *mecA* gene in the chromosome. PBP 2' shows low affinity to the all of β -lactam drugs. Therefore, the determination of gene is considered as a correct method for the antibiotic treatment procedures.

Method : In order to examine effectiveness of detecting *mecA* and *femA* genes for the identification of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and *mecI* gene in high-level-resistant MRSA, the presence of these genes in *S. aureus* and *S. epidermidis* was investigated by PCR. The types of genes were compared with phenotype by agar dilution method and investigated with MIC of methicillin.

Results : 1. The *mecA* gene detection was useful for the identification of MRSA with MRSA 100% and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) 2.7% ($P < 0.001$); and not useful for the identification of methicillin-resistant *S. epidermidis* (MRSE) with MRSE 93.8% and methicillin susceptible-*S. epidermidis* (MSSE) 52.9% ($P > 0.001$). 2. The *femA* gene detection was useful for the *S. aureus* identification ($P < 0.001$) and specificity 100% with MRSA 100% and MSSA 100%, MRSE and MSSE being 0%. 3. The *mecI* gene detection revealed MRSA 59.4%, and high-level-resistant MRSA was not detected in 39%. There was no validity of existence and nonexistence between the degree of methicillin MIC and the detection of *mecI* gene ($P > 0.001$).

Conclusion : The study concluded that the detection of both the *mecA* and *femA* genes from staphylococci by the PCR method had been considered as a correct and useful method in the identification of MRSA. *mecI* gene has been deemed as a repressor gene for high-level-resistant MRSA that is clinically useful as a standard. However, it is considered that the investigation should be done with later detected nucleotide sequencing of the *mecI* gene. (*Korean J Clin Pathol* 1999; 19: 62-9)

Key words : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, Agar dilution, Polymerase chain reaction, Comparative study, *mecI* gene, *mecA* gene, *femA* gene

서론

항균제 사용이 늘수록 기존의 항균제에 내성균이 선택적으로

증가함과 동시에 새로운 내성균이 출현하게 된다. 1940년대 초에 포도상구균 감염에 대한 치료제로 처음 penicillin이 사용된 지 얼마 되지 않은 1940년대 말에 penicillinase를 생산하는 내성균이 보고되었고, 1961년에 반합성 penicillin인 methicillin에도 내성인 균주가 보고된 이래로 현재 문제의 병원균이 되었다[1-6]. 국내의 methicillin 내성 *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant *S. aureus*, 이하 MRSA)의 분리율은 대부분의 대학병원 급에서 1980년대 초 20%미만에서 1980년대 후반에 50%로, 현재는

접 수 : 1998년 6월 11일 접수번호 : KJCP1174
수정본접수 : 1998년 11월 16일
교신저자 : 안 지 영
우 730-030 경북 구미시 공단동 250
순천향 구미병원 임상병리과
전화 : 0546-463-7151 교 319, Fax : 0546-463-7504

70%로 급증하였다. 이러한 증가는 MRSA 거의 모두가 원내감염균으로서 전파 방지가 어렵다는 것을 뜻한다[7-19]. MRSA 감염 치료에는 모든 β -lactam 항균제인 penicillin, cephalosporin, carbapenem 및 monobactam제가 효과가 없으며 aminoglycoside를 포함한 여러 항균제에 다제 내성을 나타내어 사용 가능한 약제가 매우 적다. 특히 면역부전상태의 중환자 등에서 질병의 사망을 증가와 같은 심각한 결과를 초래하므로 methicillin 내성균의 신속한 검출과 정확한 동정이 필요하다. 그러나 methicillin의 내성발현은 적절한 배양 조건하에서만 나타나기 때문에 통상적인 디스크 확산법으로는 판정이 부정확할 수 있고, 실제로는 내성균임에도 불구하고 위감수성으로 보고되어 적절한 시기에 항균제가 투여되지 못하므로 내성균이 선택적으로 자라게 되어 치료가 어렵게 되는 경향이 있다[20-23].

MRSA의 내성기전은 세균이 선천적으로 염색체 내에 *mec* (methicillin resistance determinant) A 유전자를 획득하여 약제에 친화성이 낮은 세포벽합성단백인 PBP 2'을 유도 생산하기 때문인 것으로 밝혀졌다. PBP는 세균의 세포벽 합성에 관여하는 세균 단백질로서 β -lactam 결합을 가수분해시켜 자신과 공유결합을 형성한다. 그러나 MRSA는 PBP를 PBP 2'으로 변화시켜 약제가 작용하지 못하게 하는 것으로 알려졌다[7].

mecA 유전자[24-27]는 MRSA뿐 아니라 다른 methicillin 내성 포도구균에서도 발견되었다[28-29]. 그러나 methicillin 내성 발현의 보조유전자인 *fem* (factor essential for methicillin resistance) A 유전자는 *S. aureus*에 특이하게 존재하는 것으로 보고되었다[30-33]. 최근에는 *mecI* 유전자가 *mecA* 유전자의 억제유전자로서 methicillin 내성이 발현되지 못하게 한다고 알려졌고, *mecI* 유전자가 존재하지 않거나, *mecI* 유전자 구조의 결손 또는 돌연변이 등이 생기면 methicillin에 대하여 고도내성을 나타낸다고 보고되었다[34, 35]. 그러나 고도내성주에 있어 내성 발현이 *mec* 유전자와 관계없이 다른 기전에 의한다는 보고와 더불어 methicillin 내성이 단순히 *mecA* 유전자 유무에 국한되지 않는다는 논란이 있다[36-41].

이에 본 연구자는 *S. aureus*와 *S. epidermidis*의 methicillin 내성과 감수성균을 대상으로 *mecA* 유전자를 검출하여 methicillin 내성 판정에 대한 유용성을 제시하고, *S. aureus* 동정에 있어서 *femA* 유전자 검출의 상관성을 조사하고, MRSA에서 *mecI* 유전자를 검출하여 고도내성균에서 MIC와 *mecI* 검출율의 상관성을 조사하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1995년 8월부터 1996년 1월까지 세균 동정 및 항균제 감수성 검사가 의뢰된 각종 임상검체를 혈액한천에 접종하고 37°C에 18

시간 배양하였다. 집락의 표본 염색에서 포도송이 모양의 그람양성 구균이고, mannitol에서 산을 생성하며, DNase와 coagulase 양성균주를 *S. aureus*로 동정하였다. DNase와 Coagulase 음성균주중 novobiocin에 감수성이고 mannitol 비발효, maltose 및 sucrose 발효균을 *S. epidermidis*로 동정하였고 두 균종 모두 세균 동정 및 항균제 감수성 자동분석기인 Microscan (Dade Microscan Inc. Sacramento, USA)에 Posi combo 6 panel을 이용하여 검사하였다. 이상의 방법으로 동정된 MRSA 37주, MSSA 34주, MSSE 34주, MRSE 16주를 연구 대상으로 하였다.

2. 방법

1) 배양균으로부터의 DNA 추출

혈액 한천에서 증식된 세균 집락을 PBS buffer 850 μ L와 glycerol 150 μ L를 넣은 microcentrifuge tube에 균집락을 잘 섞어 주었다. 이중 500 μ L를 microcentrifuge로 9,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 버린 다음 침전물에 500 μ L의 washing solution (10 mM Tris HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1 mM KCl)에 완전히 부유시킨 후 9,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 이 과정을 2회 반복한 후 침사물에 30 μ L의 lysis buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 0.45% Tween 20, 0.45% Triton X-100)를 넣고 용균시켰다. 원심분리 후 mineral oil 한 방울을 넣고 microtube를 microwave oven (750 watt)에 넣어 15분간 처리한 다음 1,300 rpm에서 10분간 원심분리하였고, 추출액 3 μ L를 PCR에 이용하였다.

2) Oligonucleotide 합성

mecA, *femA*용 primer는 한국생공주식회사(대전, 한국)의 MRSA kit를 이용하여 nested PCR을 시행하였고, *mecI*용 primer는 한국생공에 의뢰하여 DNA synthesizer로 합성하였다. *mecA*의 1st primer로는 MR1 (5'-ATGAGATTAGGCATC GTTCC-3')과 MR2 (5'-TGGATGACAGTACCTGAGCC-3')를, 2nd primer로는 MR1 (5'-TGGGTACAAGATGAT-ACCTTCG-3')과 MR2 (5'-TAACGATTGTGACACGATAGCC-3')를 사용하였다. *femA*의 1st primer로는 MR3 (5'-CATGATGGCGAGATTACAGG-3')과 MR4 (5'-GCTAAAGGTACTAACACACGG-3')를, 2nd primer로는 MR3 (5'-TGATCCTGTGCTACAAATTCG-3')과 MR4 (5'-TCATCACGATCAGCAAAAGC-3')를 사용하였다. *mecI*의 primer로는 5'-ATACAAATGCAAAAGGACTGG-3' 및 5'-TTC AACGACTTGATTGTTTCC-3'를 사용하였다.

3) PCR

한국생공에서 제조된 PreMix™-PCR 반응 혼합액(10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 2 U DNA polymerase, 10 mM dNTP)에 *mecA*, *femA*와 *mecI*를 각각

10 pmol 씩 넣어 사용하였다. *mecA*와 *femA*는 nested PCR을 시행하였고 *mecI*는 1차 PCR만 시행하였다. *mecA*와 *femA*의 1차 PCR은 94°C, 5분 predenaturation 시킨 후, denaturation 94°C에서 30초, annealing 55°C에서 45초, extension 72°C에서 30초를 1 cycle로 하여 30회 시행하였다. 1차 PCR에서 얻어진 산물을 1차 PCR과 동일한 과정을 거쳐 30회 시행하였다. *mecI*의 PCR은 94°C, 5분 predenaturation 시킨 후, denaturation 94°C에서 60초, annealing 55°C에서 60초, extension 72°C에서 60초를 1 cycle로 하여 30회 시행하였다. PCR 산물은 1.8% agarose gel에서 전기영동으로 분획하고 ethidium bromide로 염색하였다. 자외선 조명 하에서 *mecA* (1차 554 bp, 2차 296 bp), *femA* (1차 372 bp, 2차 218 bp)와 *mecI* (327 bp)의 각 band를 관찰하였다.

4) 한천희석법을 이용한 감수성시험(MIC)

National Committee for Clinical Laboratory Standards (이하 NCCLS) 표준 한천희석법에 따라 시험하였다. 시험세균을 tryptic soy broth (Difco)에 접종하여 배양한 후에 식염수를 써서 탁도를 McFarland의 0.5관의 농도(10^8 /mL)에 맞추고 이것을 다시 1:10으로 희석한 후 Steer's multiple inoculator를 써서 methicillin이 0.12 µg/mL에서 1,024 µg/mL로 배수 희석된 2% NaCl이 첨가된 Muller-Hinton 배지에 접종하였다. 접종배지를 35°C에 24시간 배양 후 세균 증식이 없는 항균제 최소농도를 MIC로 판독하였고, methicillin MIC가 16 µg/mL 이상인 경우 내성으로, 8 µg/mL 이하인 경우 감수성으로 판정하였고, 감수성 검사의 정도관리를 위해 *S. aureus* ATCC 29213을 동시에 시험하였다.

5) 자료분석

SAS (version 6.02)를 이용하여 *mecA*의 MRSA와 MRSE 판정에 대한 유효성 및 *femA*의 *S. aureus* 판정에 대한 유효성을 보기 위하여는 Fisher의 정확도 검정을 하였다. Methicillin MIC 정도와 *mecI* 유전자의 검출 유무와의 유효성을 보기 위하여는 카이제곱 검정을 하였다.

결 과

1. *mecA* 유전자의 검출 빈도

*S. aureus*의 *mecA* 유전자 검출율은 MRSA가 100%로 37주가 모두 양성되었고, MSSA가 2.7%로 34주 중 1주가 양성(methicillin MIC, 4 µg/mL)이었으며, 통계 분석상 MRSA 판정에 상관성이 있었다($P < 0.001$).

*S. epidermidis*의 *mecA* 유전자 검출율은 MRSE가 93.8%로 16주 중 1주가 음성(methicillin MIC, 128 µg/mL)이었으나, MSSE는 52.9%로 17주 중 9주가 양성이었으며 MRSE 판정에는 상관성이 없었다($P > 0.001$, Fig. 1, Table 1). 특히 MSSE에서

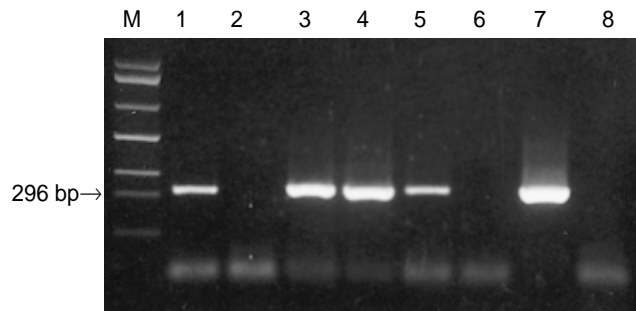


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of amplified 296 bp fragments of the *mecA* gene. The samples in each of the lanes as follows: lane M, size marker; lane 1, 3, 4, 5, 7, methicillin-resistant *S. aureus*; lane 2, 6, 8, methicillin-resistant *S. epidermidis*.

Table 1. Detection of the *mecA* gene in clinical isolates by PCR

Organism	Methicillin	MIC of methicillin (µg/mL)	No. of Strain tested	<i>mecA</i>	
				Positive	Negative
<i>S. aureus</i>	Resistant	≥ 16	37	37*	0
	Susceptible	≤ 8	34	1*	33
<i>S. epidermidis</i>	Resistant	≥ 16	16	15†	1
	Susceptible	≤ 8	17	9†	8

* $P < 0.001$; † $P > 0.001$.

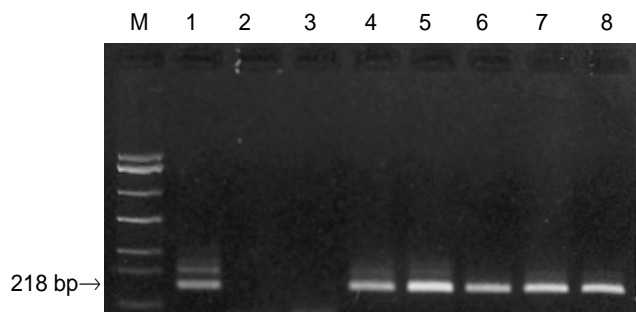


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of amplified 218 bp fragments of the *femA* gene. The samples in each of the lanes as follows: lane M, size marker; lane 1, 4, 5, 6, 7, 8, *S. aureus*; lane 2, 3, *S. epidermidis*.

mecA 유전자가 양성인 9주 중 7주(77.7%)는 methicillin에 대한 MIC가 8 µg/mL인 3주와 4 µg/mL인 4주인 것으로 나타났다.

2. *femA* 유전자의 검출 빈도

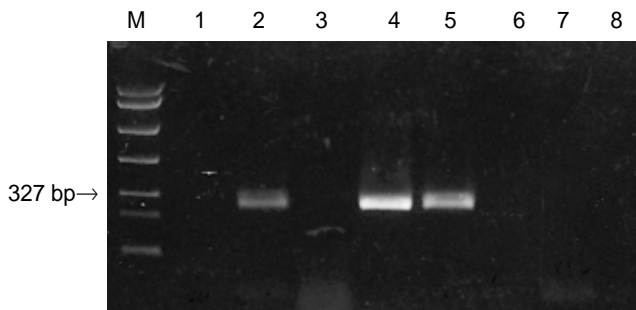
femA 유전자의 검출율은 MRSA와 MSSA가 모두 100%, MRSE와 MSSE가 모두 0%로 *S. aureus* 판정에 상관성이 있었으며($P < 0.001$), 특이도는 100%이었다(Fig. 2, Table 2).

Table 2. Detection of the *femA* gene in clinical isolates by PCR

Organism	Methicillin	No. of Strain tested	<i>femA</i> *	
			Positive	Negative
<i>S. aureus</i>	Resistant	37	37	0
	Susceptible	34	34	0
<i>S. epidermidis</i>	Resistant	16	0	16
	Susceptible	17	0	17

* $P < 0.001$.**Table 4.** Distributions of the *mecI* gene in MRSA strains

MIC of methicillin ($\mu\text{g/mL}$)	No. of Strain tested	<i>mecI</i> *	
		Positive	Negative
64	1	0	1
128	4	3	1
256	4	2	2
512	19	12	7
1024	6	5	1
>1024	3	0	3
Total	37	22 (59.4%)	15 (40.5%)

* $P > 0.001$.**Fig. 3.** Agarose gel electrophoresis of amplified 327 bp fragments of the *mecI* gene. The samples in each of the lanes as follows: lane M, size marker; lane 2, 4, 5, positive samples; lane 1, 3, 6, 7, 8, negative samples.

3. *mecI* 유전자 검출 빈도와 한천희석법에 의한 MIC 측정치의 관계

*S. aureus*에 대한 methicillin의 MIC 범위는 MSSA에 대해 2-4 $\mu\text{g/mL}$, MRSA에 대해 64-1,024 $\mu\text{g/mL}$ 이상이였다. *S. epidermidis*에 대한 methicillin의 MIC 범위는 MSSE에 대해 0.5-8 $\mu\text{g/mL}$, MRSE에 대해 16-256 $\mu\text{g/mL}$ 이었다(Table 3).

MRSA의 *mecI* 유전자 검출율은 59.4%로 37주 중 22주가 양성이었고, methicillin의 MIC 정도와 *mecI* 유전자 검출 유무 사이에는 상관성이 없었다($P > 0.001$, Fig. 3, Table 4). Methicillin의 MIC가 128 $\mu\text{g/mL}$ 이상인 고도내성주의 *mecI* 유전자 검출율은 61%로 36주 중 22주가 양성이었다.

고 찰

mecA 유전자는 Matsushashi 등[24]에 의하여 클론(clone)되고 Ryffel 등[39]에 의해 염기서열이 밝혀졌다. 그 후 PCR을 이용하여 *mecA* 유전자의 검출이 시도되어 왔는데 MRSA에 대한 *mecA* 유전자의 검출율은 90%에서 100%로 보고[42-46]되었으며 본 연구에서도 100%의 검출율로 methicillin 내성과 *mecA*의 절대적인 상관성을 보여주었다. MSSA에 대하여는 2.1%[44]와 2.9%[43]으로 보고된 바 있어 본 연구 결과 2.9%와 유사하였으나, 0%[46]나 16.7%[45]인 보고와는 차이가 있었다. *mecA* 유전자를 가지면서 methicillin 감수성을 보이는 *S. aureus*는 본 연구 결과 MRSA 16주 중 1주에서 methicillin의 MIC가 4 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났고 이는 충분한 양의 PBP 2'을 생산하지 못하는데 기인한다고 하며, 이러한 균을 어느 범주에 포함시켜야 할 지에 대하여는 논란이 있으나 *mecA*가 약제 내성을 지배하는 구조유전자인 것을 고려하였을 때 본질적으로 MRSA의 범주에 넣어야 할 것이라고 하였다. 또한 MRSA는 β -lactam제에 노출되었을 때 내성이 유도되므로 배양조건이나 약제농도 등에 의해 영향을 받기 쉬우며, 내성 발현이 억제된 상태에서 MSSA로 판정된 균이 체내에서 MRSA로 변환될 가능성이 크다고 하였다[43, 45].

Coagulase 음성 포도구균(coagulase negative staphylococci, 이하 CNS) 중 근래 분리되는 *S. epidermidis*의 methicillin 내성율은 70%로 보고되어 있고, MRSE의 95%에서 2종 이상의 약제에 내성을 보인다고 하였다[13]. Tesch 등[28]에 의해 *S. epidermidis*의 *mecA* 유전자가 클론되고, Ryffel[29]등에 의해 *S. aureus*

Table 3. Activities of methicillin against *S. aureus* & *S. epidermidis* determined by agar dilution test

Organism	Methicillin	No. cumulative % of isolates inhibited at ($\mu\text{g/mL}$):											
		0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024 >1024
<i>S. aureus</i>	Susceptible			44	100								
	Resistant								2	14	24	65	92 100
<i>S. epidermidis</i>	Susceptible	6	12	41	65	100							
	Resistant						19	50	63	94	100		

와 *S. epidermidis*의 *mecA* 유전자의 염기서열이 99% 이상 같은 것으로 밝혀진 이래로 CNS에서의 *mecA* 유전자 검출이 임상에 적용되었다. 본 연구 결과 MRSE에 대한 *mecA* 유전자의 검출율은 93.8%로서, 81.5%[32]로 보고된 결과보다 높았고, methicillin 내성 coagulase 음성 포도구균(methicillin resistant coagulase-negative staphylococci, 이하 MRCNS)에서 보고된 92.3%[42], 96.0%[43] 및 96.8%[47]와는 유사하였다. Murakami등[43]은 MRCNS 중 *S. haemolyticus*와 *S. saprophyticus*에서 *mecA* 유전자가 검출되지 않았다고 하면서 penicillinase의 과잉 생산에 의하거나, PBP 2' 이 아닌 다른 PBP 생산량 변화에 의한다고 하였다. 본 연구에서 MSSE에서의 *mecA* 유전자 검출율은 52.9%로 나타났는데 이는 40.0%[32]로 보고된 성적에 비하여 약간 높은 결과였으며 methicillin susceptible coagulase-negative staphylococci (이하 MSCNS)에 대하여 보고된 10.5%[48]와 13.3%[49]인 결과와는 많은 차이를 보였다. Hackbarth와 Chambers등[50]의 보고와 비교할 때 MSSA에서 *mecA* 검출율이 높게 나타나는 원인에 대하여는 CNS에서 내성을 유도하는 항생제의 종류에 따라 PBP2' 생산 능력이 영향을 받을 수 있어서, cephamycin 계의 항생제와 함께 배양하면 PBP2' 생산 능력을 회복하는 methicillin 내성 변이주가 있기 때문이라고 하였다. 또한 York 등[51]은 CNS에서 디스크 확산법은 예민도와 특이도가 좋지 않고 *mecA* 유전자를 검출하는 것이 더 정확하다고 하였다. 또한 *mecA* 유전자 검출율과 비교하여 CNS의 감수성에 대한 NCCLS의 MIC 기준이 높게 설정되어 있어 내성 균주가 적게 판정된다고 하였으며, Oxacillin MIC의 내성 판정 기준인 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 제시하였다. McDonald 등[52]도 *S. aureus*에 대한 methicillin의 MIC가 내성이거나 감수성인 현저한 이점(bimodal) 분포 양상을 보이나 이와는 달리 *S. epidermidis*에서는 검사한 대부분의 균주가 oxacillin의 MIC가 1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 있었다고 하면서, *mecA* 유전자 검출에 근거하였을 때 oxacillin의 내성 판정 기준인 MIC를 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 제시하였다. 본 연구 결과 *mecA* 유전자의 검출율은 MRSA와는 93.8%로 일치율이 높았지만, MSSE의 경우 52.9%로 낮은 것은 MRSE의 감수성 시험이 부정확하며 과오가 많을 것으로 생각되었다. CNS는 *S. aureus* 보다 증식이 느리기 때문에 methicillin의 정확한 감수성 시험이 어려우므로 methicillin 내성 시험을 위해서는 첫째로 oxacillin 디스크법으로 35°C에 24시간 배양하고, 중간 감수성이면 다시 35°C에 24시간 더 배양한 후 판독하며, 둘째로 oxacillin agar 선별법으로 35°C에 48시간 배양 후 판독하는 것으로 권장되고 있다[53]. 그 외에 PCR 과정에서 혼입된 물질 등에 의한 위양성, 배지의 종류 및 내성 정도에 따라 검출율이 다를 수 있다고 제시되었다[54].

femA 유전자는 methicillin 내성의 보조유전자로서 *mecA* 유전자의 존재나 항균제감수성 여부에 관계없이 *S. aureus*에서 모두 검출된다고 하며, 세균 세포벽의 pentaglycin 가교 반응에 주요한 역할을 한다고 보고되었다[30-33]. *S. aureus*에 대한 *femA*

유전자의 검출율은 이제까지 100%로 보고되었고[32, 55], 본 연구에서도 100%로 높은 상관성을 보여주었다.

Methicillin 내성 발현의 조절유전자는 1990년 Tesch 등[34]에 의해 *mec* 유전자 영역의 상류에 있는 두 개의 유전자 *mecR1*과 *mecI*가 보고되었다. *mecI*는 PBP 2' 생산 억제인자 MecI를 code하며, *mecR1*은 PBP 2'의 생산 유도에 필요한 signal 전달 단백질인 MecR1을 code한다고 알려졌다. 근래 분리되는 고도내성 MRSA의 대부분은 *mec* 조절유전자의 파괴와 plasmid상의 β -lactamase operon에 의한 조절의 두 특징을 갖고 있다고 알려져 있다[7, 34]. Suzuki 등은 MRSA 중에서도 MIC가 매우 높은 고도내성 중에서 *mecI* 유전자를 조사한 결과 40.5%가 검출되지 않았고, *mecI*가 검출된 6주 모두가 점돌연변이를 나타냈다고 하였으며, *mecI* 유전자의 돌연변이 결과로 활성이 억제되어 *mecA* 유전자의 전사단계가 탈억제되어 내성을 나타낸다고 하였다. Methicillin 고도내성은 PBP 2' 생산과 MIC정도사이에는 상관관계가 없고, *mecI* 유전자의 존재 유무에 의해 단순히 결정되는 것이 아니며, 내성의 정도와 *mec* 조절유전자의 존재 유무와는 상관성이 없다고 하였다. 이와는 달리 Ryffel 등[39]은 MRSA의 고도내성이 *mecA*나 *femA*와 관련이 없는 알려지지 않은 어떤 염색체 상의 돌연변이에 의한다고 보고하였다. 본 연구 결과 MRSA 37주 중 MIC가 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 1주를 제외한 36주가 MIC 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 고도내성주였고, 36주 중 14주(38.9%)에서 *mecI* 유전자가 검출되지 않았으며, methicillin의 MIC 정도와 *mecI* 유전자의 존재 유무와는 상관성이 없어 Suzuki 등[47]과 일치되는 결과를 얻을 수 있었다. 그러므로 이상의 결과를 종합해보면 PCR을 이용하여 *mecA*, *femA* 유전자를 검출한 결과 MRSA 판정에 상관성이 있는 것으로 생각되었고, *mecI* 유전자를 검출한 결과 고도내성주의 39%에서 검출되지 않았으므로 억제유전자로서 임상에서 유용한 지표로 제시될 수 있으리라 생각되었다. 그러나 추후 *mecA* 유전자의 전사단계에서의 연구 등과 아울러 검출된 *mecI* 유전자의 점돌연변이나 결손 등은 뉴클레오티드 배열순 검사(nucleotide sequencing)등을 통해 연구되어야 할 것으로 사료되었다.

요 약

배경 : 포도구균은 그람양성 구균중 임상에서 가장 흔히 분리되는 주요 병원균으로 최근 현저한 methicillin 내성율의 증가를 보이고 있다. Methicillin 내성 포도구균에 의한 감염은 모든 β -lactam제에 내성일 뿐 아니라 다약제 내성을 나타내므로 이 세균 감염은 치료가 어렵다. Methicillin 내성에 관여하는 유전자로는 내성유발 유전자인 *mecA*, 그 보조유전자인 *femA* 및 내성억제 유전자인 *mecI* 등이 보고되어 있으며, 내성을 나타내는 기전은 세균이 염색체 내에 *mecA* 유전자를 획득하여 약제인화성이 낮은 세포벽합성단백인 penicillin binding protein (이하 PBP) 2'을 생산하기 때문인 것으로 알려져 있다. 그러므로 최근에는 내성균주를

발견하여 치료지침을 제시하는 수단으로서 유전자 검출이 매우 정확한 방법으로 제시되고 있다.

방법 : 임상검체에서 분리된 *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant *S. aureus* 이하, MRSA 및 methicillin-susceptible *S. aureus* 이하, MSSA)와 *Staphylococcus epidermidis* (methicillin-resistant *S. epidermidis* 이하, MRSE 및 methicillin-susceptible *S. epidermidis* 이하, MSSE)를 대상으로 증합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR)법을 이용하여 methicillin 내성의 구조유전자인 *mecA*를 검출하여 나타난 유전자형을 한천희석법상 나타난 표현형과 비교하고, methicillin 억제유전자인 *mecI* 유전자와 methicillin 내성 *S. aureus* 의 methicillin 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, 이하 MIC)를 비교하여 내성기전을 조사하고자 하였다. 또한 MRSA와 MSSA에 대하여는 *S. aureus*에 특이하게 존재하는 것으로 알려진 *femA* 유전자를 검출하여 동정 결과와의 상관성을 관찰하였다.

결과 : 1. *mecA* 유전자의 검출율은 MRSA가 100%, MSSA가 2.7%로 MRSA 판정에 상관성이 있었고($P < 0.001$), MRSE가 93.8%, MSSE가 52.9%로 MRSE 판정에는 상관성이 없었다($P > 0.001$). 2. *femA* 유전자의 검출율은 MRSA와 MSSA가 모두 100%, MRSE와 MSSE가 모두 0%로 *S. aureus* 판정에 상관성이 있었으며($P < 0.001$), 특이도는 100%이었다. 3. *mecI* 유전자 검출율은 MRSA가 59.4%이었고, 고도내성인 MRSA에서는 61%이었다. Methicillin MIC 정도와 *mecI* 유전자 검출 유무 사이에는 상관성이 없었다($P > 0.001$).

결론 : 포도구균에서 PCR법을 이용한 *mecA*와 *femA* 유전자 검사가 MRSA 판정에 있어서 정확하고 유용한 방법인 것으로 생각되었다. 또한 *mecI* 유전자를 검출한 결과 고도내성 MRSA의 억제유전자로서 임상에서 유용한 지표로 제시될 수 있으리라 생각되었다.

참고문헌

- Brumfitt W and Hamilton-Miller J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1989; 320: 1188-96.
- Cohen SH, Morita MM, Bradford M. A seven years experience with methicillin-resistant with *Staphylococcus aureus*. *Am J Med* 91(S3B) 1991: 233-7.
- Jevons MP. "Celbenin"-resistant staphylococci. *Br Med J* 1961; 1: 124-5.
- Berrett FF, McGhee RF, Finland M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City hospital. *N Engl J Med* 1968; 279: 441-9.
- Harley RW, Hightower AW, Khabbaz RF, Thornsberry C, Mortone WJ, Allen JR, et al. The emergence of methicillin-resistance infections in United States hospitals. *Ann Intern Med* 1982; 97: 297-308.
- Locksley RM, Cohen ML, Quinn TC, Tompkins LS, Coyle MB, Kirihara JM, et al. Multiply antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: Introduction transmission and evolution of nosocomial infection. *Ann Intern Med* 1982; 97: 317-24.
- 정운섭 및 이경원. 병원균의 항균제 내성과 기전. 서울 : 서흥출판사, 1997: 64-5.
- 정희영. 항생제감성의 변화추세-몇 가지 병원감염균을 중심으로. *감염* 1986; 18: 1-10.
- 김구엽, 이희주, 서환조. 세균의 항생제감수성변화의 추이-1986년-1993년 결과. *감염* 1995; 27: 119-40.
- 정운섭. 임상검체에서 분리된 세균의 항균제 내성율의 변화추세. *감염* 1989; 21: 243-55.
- 정운섭. 항균제 내성의 최근 동향. *대한화학요법학회지* 1991; 9: 5-11.
- 이경원, 정운섭, 권오현, 박홍섭, 김준명. 임상검체에서 분리된 세균의 항균제 감수성. *대한 화학요법학회지* 1993; 11: 158-68.
- 박승철, 정희진, 김우주, 김민자, 김성일, 김영기. 8종의 methicillin 내성 포도상구균의 항균제 감수성에 관한 고찰. *대한화학요법학회지* 1995; 13: 151-7.
- 강문원 및 김양리. Methicillin 내성 포도구균 감염. *대한화학요법학회지* 1993; 11: 17-26.
- 정운섭, 이경원, 신정원, 신희봉, 이종백. Arbekacin의 methicillin 내성 *Staphylococcus aureus*와 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 항균력. *대한화학요법학회지* 1997; 15: 391-27.
- 석성익 및 박승철. 황색포도구균 감염. *감염* 1985; 17: 115-22.
- 김미나, 정재심, 김봉철, 송재훈, 배직현. 원내감염과 원외감염에서 분리된 원인균의 항균제 감수성 비교. *감염* 1993; 25: 333-42.
- 김정만, 김아성, 김경희, 김태겸, 한진영, 김인후. Methicillin내성 황색 포도상구균에 의한 원내감염의 역학조사를 위한 *mec* 유전자형 및 *coagulase* 형에 관한 연구. *대한임상병리학학회지* 1997; 17: 588-97.
- 강현, 이강영, 강영숙, 정운섭, 이형환. *Staphylococcus*의 methicillin 내성. *대한미생물학회지* 1989; 24: 427-34.
- Hartman BJ and Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29: 85-92.
- Thronsberry C and McDougal LK. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 1084-91.
- Barry AL and Jones RN. Reliability of high-content disks and modified broth dilution tests for detecting staphylococcal resistance to the penicillinase-resistant penicillins. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1897-901.
- Richard P, Meyran M, Carpentier E, Thabant A, Drugeon H. Comparison of phenotypic methods and DNA hybridization for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 613-7.
- Matsuhashi M, Song MD, Ishino F, Wachi M, Doi M, Inoue M, Ubukata K, et al. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to β -lactam antibiotics in

- Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1986; 167: 975-80.
25. Ubukata K, Nonoguchi R, Matsushashi M, Konno M. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J Bacteriol* 1989; 171: 2882-5.
 26. 정선식. 항생제 내성발현의 기전. *대한화학요법학회지* 1993; 11: 1-16.
 27. Livermore DM. β -lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-84.
 28. Tesch W, Strässle A, Berger-Bächi B, O'Hara D, Reynolds P, Kayser H. Cloning and expression of methicillin resistance from *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus carnosus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1494-9.
 29. Ryffel C, Tesch W, Birch-Machin I, Reynolds PE, Baeberis-maino L, Kayser FH, et al. Sequence comparison of *mecA* genes from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Gene* 1990; 94: 137-8.
 30. Maidhof H, Reincke B, Blümel P, Berger-Bächi B Labischinski H. *femA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affect glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol* 1991; 173: 3507-13.
 31. Henze U, Sidow T, Wecke J, Labischinski H, Berger-Bächi B. Influence of *femB* on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1993; 175: 1612-20.
 32. Kobayashi N, Wu H, Kojima K, Taniguchi K, Urasawa S, Uehara N, et al. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 1994; 113: 259-66.
 33. Lencastre H and Tomasz A. Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2590-8.
 34. Tesch W, Ryffel C, Strässle A, Kayser FH, Berger-Bächi B. Evidence of a novel staphylococcal *mec*-encoded element (*mecR*) controlling expression of penicillin-binding protein 2'. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1703-6.
 35. Suzuki E, Kuwahara-Arai K, Richardson F, Hiramatsu K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant staphylococcus clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1219-26.
 36. Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bächi B. Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 25-31.
 37. Murakami K and Tomasz A. Involvement of multiple genetic determinations in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1989; 171: 874-9.
 38. Mempel M, Feucht H, Ziebuhr W, Endres M, Laufs R, Grüter L. Lack of *mecA* transcription in slime-negative phase variants of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1251-5.
 39. Ryffel C, Strässle A, Kayser FH, Berger-Bächi B. Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 724-8.
 40. Tomasz A, Drugeon HB, Lencaster HM, Jabes D, McDougall L, Bille J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1869-74.
 41. Bignardi GE, Chapman WA, Johnson AP, Speller CE. Detection of the *mecA* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* with borderline or low level methicillin resistance. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 53-63.
 42. 이혜경, 박연준, 한경자, 김병기, 강문원, 심상인. 포도구균의 메티실린 검출을 위한 표준감 수성 검사와 중합효소연쇄반응을 이용한 *mecA* 검출의 비교. *감염* 1996; 28: 429-35.
 43. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2240-4.
 44. Ubukata K, Nakagami S, Nitta A, Yamane A, Kawakami S, Sugiyura M, et al. Rapid detection of the *mecA* gene in methicillin resistant staphylococci by enzymatic detection of polymerase chain reaction products. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1728-31.
 45. Tokue Y, Shoji S, Satoh K, Watanabe A, Motomiya M. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 36: 6-9.
 46. 김정만, Kubo N, Sakurabayashi I. PCR 법을 이용한 MRSA 신속 검사법에 관한 임상적 평가. *대한임상병리학회지* 1993; 13: 387-93.
 47. Suzuki E, Hiramatsu K, Yokota T. Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for *mecA* gene distribution. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 429-34.
 48. Shimaoka M, Yoh M, Segawa A, Takarada Y, Yamamoto K, Honda T. Development of enzyme-labeled oligonucleotide probe for detection of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 1994; 32: 1866-9.
 49. 장은아, 김혜련, 이미경, 박애자. 포도상구균에서의 *mecA*, *femA*, *femB* 유전자 검출. *대한 임상병리학회지* 1996; 16(부록 1호): S68.
 50. Hackbarth CJ and Chambers HF. Methicillin-resistant *Staphylococci*. Detection methods and treatment of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 995-9.
 51. York MK, Gibbes L, Chehab F, Brooks G. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing method to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 249-53.

52. McDonald CL, William EM, Fass RJ. *Revised interpretation of oxacillin MICs for Staphylococcus epidermidis based on mecA detection. Antimicrob Agents Chemother* 89; 33: 995-9.
53. NCCLS. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testings. 8th ed. Wayne, Pa. : National committee for Clinical Laboratory Standards, 1998: M100-S8.*
54. Tashi K, Murakami C, Yamashita K. *Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using PCR and non-radioactive DNA probe. 臨床病理* 1992; 40: 541-6.
55. Ünal S, Hoskins J, Flokowitsch JE, Ernie Wu CY, Preston DA, Skatrud P. *Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol* 1992; 30: 1685-91.